

粘虫不同发育期体内储存蛋白的检测及苦皮藤素 V 对其含量的影响

马彩霞, 刘惠霞*, 吴文君

(西北农林科技大学农药研究所, 陕西杨凌 712100)

摘要: 采用 PAGE 和 SDS-PAGE 以及 Western blot 的方法, 分析了粘虫 *Mythimna separata* 幼虫、蛹及成虫体内的储存蛋白。结果表明, 粘虫体内存在两种储存蛋白, 其中一种为 SP-1, 即幼虫特异性储存蛋白, 从 6 龄粘虫幼虫的 2 日龄开始出现在血淋巴中, 到末日龄时达到峰值, 停止取食后从血淋巴中消失; 另一种为 SP-3, 在化蛹时开始出现在脂肪体中, 一直到成虫期仍可持续表达, 因此属于持续性储存蛋白。SP-1 为分子量约 94 kD 和 100 kD 的 2 种亚基组成的蛋白质, 而 SP-3 为分子量约 94 kD 的 1 种亚基组成的蛋白质。SP-1 含 8.16% 的芳香类氨基酸, 3.06% 的甲硫氨酸。经苦皮藤素 V 亚致死剂量处理 5 龄粘虫幼虫后的 6 龄 2、3、4 日龄粘虫幼虫体内储存蛋白的含量明显低于对照组, 对 5 日龄后粘虫处理组和对照组体内储存蛋白的含量及雌性成虫产卵量没有明显影响。

关键词: 粘虫; 苦皮藤素 V; 储存蛋白; 血淋巴; 脂肪体; 亚致死剂量; PAGE

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)01-0058-06

Detection of storage proteins in different developmental stages of *Mythimna separata* and the effect of celangulin V on their content

MA Cai-Xia, LIU Hui-Xia*, WU Wen-Jun (Institute of Pesticide, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The storage proteins in *Mythimna separata* were studied by means of native PAGE, SDS-PAGE and Western blot. The results indicated that there were two storage proteins (SP-1 and SP-3) in *M. separata*. SP-1 was detected on the 2nd day of the 6th instar of *M. separata*, and its concentration in the hemolymph increased with the age and reached to a peak on the last day of the 6th instar. SP-1 disappeared in the hemolymph when the larva ceased feeding. In the adult stage only SP-3 was found. SP-3 as persistent storage protein appeared in the fat body of pupa, and was continuously expressed till the adult stage. SP-1 was composed of two subunits of the molecular size of 94 kD and 100 kD respectively. SP-3 was composed of one subunit in size of 94 kD. The native molecular weights of these two storage proteins were all 550 kD. Analysis of the amino acid compositions of SP-1 showed that the content of aromatic acids (Phe and Tyr) was 8.16% and the content of methionine 3.06%. The contents of the storage proteins in 2nd, 3rd, 4th day of the last instar larvae treated with celangulin V in the sublethal dosage were markedly lower than that in the control group. But beyond the 5th day of the last instar, no difference was tested in the contents of the storage proteins and the number of eggs laid per female adult between the group treated with celangulin V and the control.

Key words: *Mythimna separata*; celangulin V; storage protein; hemolymph; fat body; sublethal dosage; PAGE

储存蛋白(storage protein, SP)是昆虫体内普遍存在的一类特异性血淋巴蛋白, 在昆虫中含量丰富, 且具有多种功能。这类蛋白由幼虫或若虫脂肪体合

成, 然后释放进入血淋巴, 化蛹时又由脂肪体摄取, 当成虫器官发育和新组织形成时, 再次进入血淋巴, 作为蛋白质和氨基酸的来源, 并对生长发育和生殖

具有重要的作用(Levenbook, 1985)。

关于昆虫体内储存蛋白的研究,国外已对脉翅目(Kunkel and Lawler, 1974),直翅目(de Kort and Koopmanschap, 1987; Wyatt, 1990),半翅目(Gonzalez and Soulages, 1991; Faria *et al.*, 1994),鳞翅目(Tojo *et al.*, 1978; Telfer and Kunkel, 1983; Kunkel *et al.*, 1990),双翅目(Munn *et al.*, 1969; Brock and Roberts, 1983),鞘翅目(Koopmanschap *et al.*, 1992)及膜翅目(Ryan *et al.*, 1984; Danty *et al.*, 1998)等昆虫体内的储存蛋白进行了研究报道,但对我国主要农业害虫粘虫 *Mythimna separata* 体内的储存蛋白国内外并未见报道。本文通过对粘虫体内储存蛋白的研究,力图从昆虫生理学的角度为这一害虫的防治提供新的思路,寻找更有效的防治方法。

苦皮藤素 V 是从杀虫植物苦皮藤 *Celastrus angulatus* Max. 根皮中分离的一种对昆虫具毒杀活性的新化合物。以往的研究表明,苦皮藤素 V 作为杀虫剂在致死剂量下,可导致粘虫急性中毒,破坏其中肠肠壁细胞,致使粘虫肠壁穿孔,血淋巴大量流失致死(吴文君等, 1994)。由此可见,致死剂量的苦皮藤素 V 可以直接杀死粘虫,但当试虫摄食的苦皮藤素 V 低于致死剂量时,试虫可能继续存活,存活的试虫会由于慢性中毒而不能正常的生长发育、生殖及产卵(刘惠霞等, 2003)。本文通过研究苦皮藤素 V 对粘虫生殖有重要作用的储存蛋白的影响,进一步明确其在亚致死剂量下对粘虫生长发育及生殖的影响,从而拓宽苦皮藤素 V 杀虫毒理学的研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与试虫

试剂:高分子量标准蛋白试剂盒和低分子量标准蛋白试剂盒为 Pharmacia 公司产品;碱性磷酸酶标记的羊抗兔的抗体为 Sigma 公司产品;NBT 和 BCIP 为华美公司产品;抗血清由 Tojo Sumio 惠赠,分别为抗 SP-1、SP-2 和 SP-3 的抗体(为兔抗);苦皮藤素 V 纯度 95% 以上(由西北农林科技大学农药研究所提供),临用时配成浓度不同的丙酮溶液。

粘虫由本实验室提供,为以麦苗饲养的标准化试虫。

1.2 方法

1.2.1 血淋巴样品制备:参照 Tojo 和 Toyoshi (1994)的方法,挑选生长发育正常的 1~6 龄粘虫幼虫,剪去幼虫腹足,取血淋巴于预冷的放有少许苯基

硫脲的 1.5 mL eppendorf 管中,4℃ 5 000 g 离心 10 min,取上清液用磷酸盐缓冲液(PBS: 20 mmol/L Na_3PO_4 , 200 mmol/L NaCl, 2 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 0.5 mmol/L PMSF, 2 mmol/L DTT)稀释 5 倍,储存在 -75℃ 供试。

1.2.2 脂肪体样品制备:参照 Tojo 和 Toyoshi 等 (1994)的方法,在冰冷的 PBS 中解剖 1~6 龄粘虫幼虫,取脂肪体,称重,然后加入 5 倍其体积的 PBS (g/mL)研磨,离心(5 000 g, 4℃, 10 min),取上清液,然后置于 -75℃ 保存供试。

取预蛹、蛹和成虫,对于预蛹和蛹,剪开体壁,去掉体表和内脏,而对于成虫,则剪掉腹部,同样去掉体表和内脏。由于蛹和成虫体内的血淋巴含量极少且在解剖过程中大部分流失,所以剩余组织主要为脂肪体,称重,然后加入 5 倍其体积的 PBS (g/mL)研磨,离心(5 000 g, 4℃, 10 min),取上清液,然后置于 -75℃ 保存供试。

以上所有操作均在 4℃ 下进行。

1.2.3 粘虫体内储存蛋白的 PAGE 分析:采用不连续体系,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 3.9%,上样量为 30 μL ,在 150V 恒定电压下进行,采用考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

1.2.4 粘虫体内储存蛋白的 SDS-PAGE 分析:采用不连续体系,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%,上样量为 30 μL ,在 20 mA 恒定电流下进行,采用考马斯亮蓝 R-250 进行染色。

1.2.5 粘虫体内储存蛋白的 Western 印迹分析:参照《精编分子生物学实验指南》(F. 奥斯伯等, 1999)进行,碱性磷酸酶标记的羊抗兔的抗体以 1:5 000 稀释使用。

1.2.6 苦皮藤素 V 对粘虫致死中浓度的测定:采用常规夹毒叶片法进行。

1.2.7 苦皮藤素 V 对粘虫体内储存蛋白的影响:采用胃毒法将 1 μL LC_{45} 浓度的药剂点滴于直径 0.8 cm 的圆形叶片上,饲以饥饿 12 h 的蜕皮 1 天的 5 龄粘虫幼虫,将未致死但叶片被取食完的粘虫幼虫一直饲养,供以后试验;而对照组饲以点滴 1 μL 丙酮溶液的直径 0.8 cm 的圆形叶片。每组 30 头试虫,重复 3 次。血淋巴和脂肪体样品制备同 1.2.1 和 1.2.2。

1.2.8 储存蛋白的纯化和氨基酸组分的测定:按照以上 SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶比例准备 3 mm 厚的凝胶,上样时尽可能加满胶孔,电泳结束后取下凝胶,置于预冷的 0.25 mol/L KCl 溶液中浸泡 5~10

min, 重蒸水冲洗, 再置于冰冷的重蒸水中(含 1 mmol/L DTT), 于冰上切下目的条带, 放入透析袋中, 在 100 mA 的条件下进行电透析 0.5~1 h, 然后将透析液置于 PBS 溶液中透析 24 h(其间更换透析液 2~3 次), 即得纯化蛋白, 保存于 -20℃ 备用。

将纯化的储存蛋白用于氨基酸组分的测定, 测定由西北农林科技大学中心实验楼氨基酸分析室完成。

1.2.9 苦皮藤素 V 对粘虫成虫产卵量的影响: 将 1.2.7 的试虫继续饲养, 直至羽化, 将羽化的成虫(雌性和雄性比例相同)处理组 and 对照组分开饲养, 并饲以糖水, 每天记载产卵量, 直到死亡。每组 30 头试虫, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 粘虫体内储存蛋白的检测

2.1.1 粘虫体内储存蛋白的检测: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)法检测了 1~6 龄粘虫幼虫、蛹中的储存蛋白, 结果见图 1。

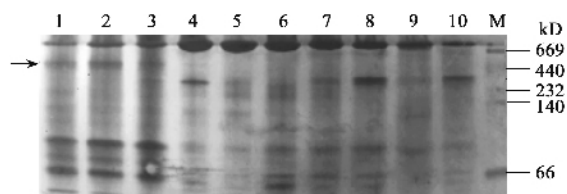


图 1 不同龄期粘虫幼虫及蛹中蛋白质的 PAGE 图

Fig. 1 PAGE of proteins from different instar larvae and pupa of *M. separata*

1: 蛹 Pupa; 2: 血淋巴中 6 龄末 The last day of the 6th instar in hemolymph; 3: 血淋巴中 6 龄第 2 天 The 2nd day of the 6th instar in hemolymph; 4: 血淋巴中 6 龄第 1 天 The 1st day of the 6th instar in hemolymph; 5: 脂肪体中 6 龄第 2 天 The 2nd day of the 6th instar in the fat body; 6, 7, 8, 9, 10: 分别为 5 龄, 4 龄, 3 龄, 2 龄, 1 龄血淋巴中的蛋白质 Hemolymph proteins of the 5th, 4th, 3rd, 2nd, and 1st instar larva, respectively; M: 分子量标准 Marker

由图 1 可看出, 6 龄粘虫血淋巴中开始出现一条分子量在 669 kD 与 440 kD 之间的蛋白带, 它于 6 龄第 2 日龄(图 1, 泳道 3)开始出现在血淋巴中, 直至蛹期尚存, 与已知储存蛋白分子量约 400~550 kD (Telfer and Kunkel, 1991) 相近, 并根据它出现及存在的时间确定其为储存蛋白带(SP), 即粘虫幼虫血淋巴及蛹中存在的储存蛋白。

2.1.2 5~6 龄粘虫血淋巴中储存蛋白的检测: 根据上述检测的储存蛋白出现的时间, 采用 SDS-PAGE

法检测了 5~6 龄不同日龄的粘虫幼虫血淋巴中的储存蛋白, 结果见图 2。

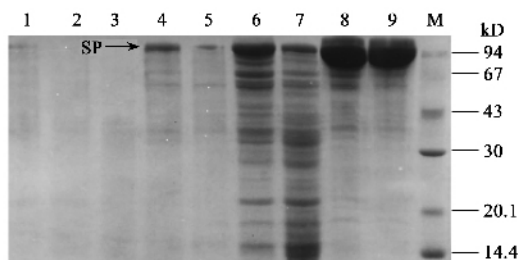


图 2 5~6 龄不同日龄的粘虫幼虫血淋巴中蛋白质的 SDS-PAGE 图

Fig. 2 SDS-PAGE of hemolymph proteins from *M. separata* larvae of different day old in the 5th to the 6th instar

1: 5 龄第 3 天 The 3rd day of the 5th instar; 2: 5 龄末 The last day of the 5th instar; 3: 6 龄第 1 天 The 1st day of the 6th instar; 4: 6 龄第 3 天 The 3rd day of the 6th instar; 5: 6 龄第 2 天 The 2nd day of the 6th instar; 6: 6 龄第 5 天 The 5th day of the 6th instar; 7: 6 龄第 4 天 The 4th day of the 6th instar; 8: 6 龄第 6 天 The 6th day of the 6th instar; 9: 6 龄末 The last day of the 6th instar; M: 分子量标准 Marker.

由图 2 可看出, 6 龄粘虫幼虫血淋巴开始出现一条蛋白带 SP, 其分子量与 Marker 分子量 94 kD 的迁移率一致, 它于 6 龄第 2 日龄开始出现, 且含量随日龄的增长而升高, 6 日龄至末日龄达最高, 根据其出现和存在的时间以及迁移率认为 SP 为分子量约 94 kD 的粘虫幼虫血淋巴储存蛋白。

2.1.3 粘虫脂肪体中储存蛋白的检测: 采用 SDS-PAGE 法检测了 5 龄末至预蛹期粘虫脂肪体中的储存蛋白, 结果见图 3。

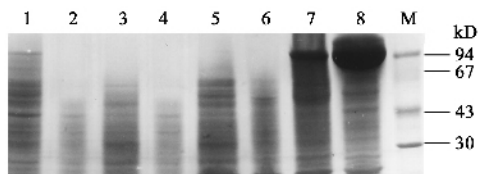


图 3 5 龄末至预蛹期粘虫脂肪体蛋白质的 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE of fat body proteins from *M. separata* larvae of different day old in the 5th to 6th instar and prepupa

1: 5 龄末 The last day of the 5th instar; 2, 4: 6 龄第 1 天 The 1st day of the 6th instar; 3: 6 龄第 2 天 The 2nd day of the 6th instar; 5: 6 龄第 4 天 The 4th day of the 6th instar; 6: 6 龄第 6 天 The 6th day of the 6th instar; 7: 6 龄末 The last day of the 6th instar; 8: 预蛹期 Prepupa; M: 分子量标准 Marker.

由图 3 可看出, 6 龄末日龄粘虫幼虫脂肪体开始出现一条蛋白带 SP, 并在预蛹期含量剧增, SP 的

电泳迁移率与分子量为 94 kD 的 Marker 相当,并根据其在脂肪体内出现时间及含量认为,SP 即为分子量约 94 kD 的粘虫储存蛋白,并且这种蛋白化蛹时被脂肪体摄取。

2.1.4 粘虫蛹期和成虫期储存蛋白的检测及 Western 印迹分析:采用 SDS-PAGE 法检测了粘虫蛹期和成虫期体内的储存蛋白(图 4);并分别将蛹期和成虫期的储存蛋白转移到硝酸纤维素膜上进行 Western 印迹分析,所使用的一抗分别为储存蛋白的抗体 anti-SP-1,anti-SP-2 和 anti-SP-3,实验结果见图 5、图 6 和图 7。

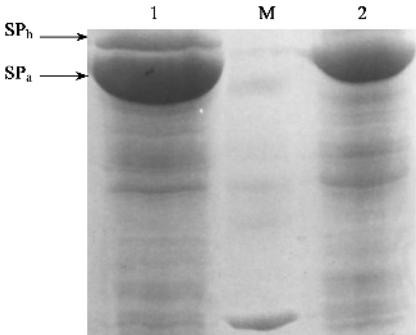


图 4 粘虫蛹和成虫期蛋白质的 SDS-PAGE 图
Fig. 4 SDS-PAGE of proteins of pupa and adult of *M. separata*
1: 蛹 Pupa; 2: 成虫 Adult; M: 分子量标准 Marker.

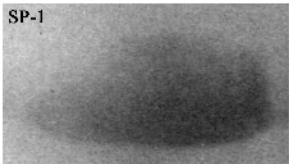


图 5 粘虫蛹期储存蛋白 Western 印迹图
Fig. 5 Western blot of storage protein from pupa of *M. separata* with anti-SP-1

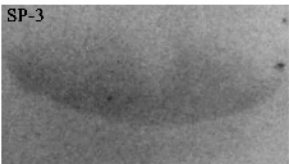


图 6 粘虫蛹期储存蛋白的 Western 印迹图
Fig. 6 Western blot of storage protein from pupa of *M. separata* with anti-SP-3

由图 4 可以看出,粘虫蛹期存在分子量约 94 kD 和 100 kD 的两条蛋白带,定名为 SP_a 和 SP_b,而成虫体内存在一条分子量约 94 kD 的蛋白带,并由图 1 可知,非变性的储存蛋白分子量约 550 kD,根据图 4

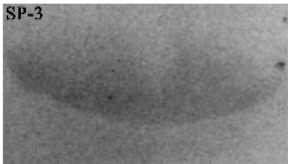


图 7 粘虫成虫期储存蛋白的 Western 印迹图
Fig. 7 Western blot of storage protein from adult of *M. separata* with anti-SP-3

SDS-PAGE 变性的蛋白亚基分子量大小(94 kD 和 100 kD)以及它在粘虫体内出现的时间认为,此储存蛋白由 2 种亚基组成,而成虫期储存蛋白由 1 种亚基组成。又由图 5 和图 6 可知,蛹期存在 2 种储存蛋白 SP-1 和 SP-3;而由图 7 可看出,成虫期的蛋白带 SP 只与 SP-3 的抗血清起反应,同样,我们也将此蛋白命名为 SP-3。SP-1 在成虫羽化后即告消失,所以 SP-1 为幼虫特异性储存蛋白,而 SP-3 在成虫期仍持续表达,因此为成虫持续性储存蛋白。

2.1.5 SP-1 的氨基酸组分及含量的测定:通过对 6 龄粘虫幼虫血淋巴中 SP-1 进行纯化,测得该储存蛋白的氨基酸组分及含量见表 1。

表 1 储存蛋白 SP-1 中氨基酸组分及含量 (mg/100 mL)

Table 1 Amino acid composition and content (mg/100 mL) of storage protein SP-1							
氨基酸	Amino acid	含量	Content	氨基酸	Amino acid	含量	Content
Asp		1.0980		Met		0.3548	
Thr		0.6948		Ile		1.1320	
Ser		0.7118		Leu		1.098	
Glu		1.4660		Tyr		0.2809	
Pro		0.6880		Phe		0.6653	
Gly		1.1100		Lys		0.7193	
Ala		0.7247		His		0.1831	
Cyr		0.0076		Arg		0.3337	
Val		0.3346		总计	Total	11.6026	

由表 1 可以看出,SP-1 中芳香类氨基酸即 Tyr 和 Phe 的含量为 8.16%,Met 的含量为 3.06%。其芳香类氨基酸的含量与海灰翅夜蛾 *Spodoptera litura* 中 SL-1 的芳香类氨基酸含量 8.1% 一致(Tojo and Toyoshi, 1994)。

2.2 苦皮藤素 V 对 5 龄粘虫致死中浓度及亚致死浓度的确定

为了确定苦皮藤素 V 对 5 龄粘虫幼虫的亚致死剂量,采用常规夹毒叶片法测定了苦皮藤素 V 对 5 龄粘虫幼虫的致死中浓度,结果如下:

应用回归方程求得: $y = 6.2873 + 1.4421x$; $r = 0.9579$

从而求得: $LC_{50} = 0.128$ g/mL 置信限为 0.0843

~ 0.1944

由此确定处理试虫的亚致死中浓度为 $LC_{45} = 0.105 \text{ g/mL}$ 。

2.3 苦皮藤素 V 亚致死浓度对试虫储存蛋白的影响

经苦皮藤素 V 亚致死浓度处理的粘虫和对照组试虫体内储存蛋白 SDS-PAGE 图谱。

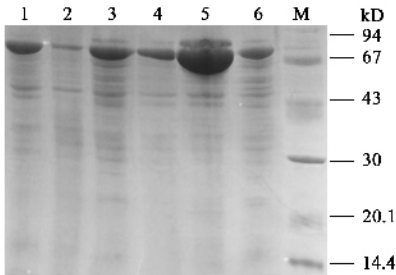


图 8 苦皮藤素 V 处理组和对照组粘虫幼虫血淋巴中储存蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 8 SDS-PAGE of storage proteins in hemolymph from *M. separata* larvae of the group treated with celangulin V and the control group

1 3 5 : 分别为对照组 6 龄第 2 3 4 天 The 2nd, 3rd, 4th day of the 6th instar larva of the control group respectively ; 2 4 6 : 分别为处理组 6 龄第 2 3 4 天 The 2nd, 3rd, 4th day of the 6th instar larva of the treatment group, respectively ; M : 分子量标准 Marker.

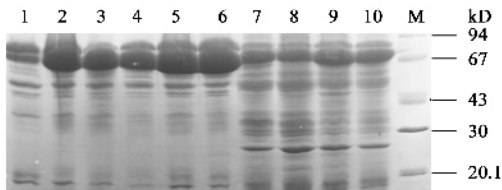


图 9 苦皮藤素 V 处理组和对照粘虫幼虫和蛹期储存蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 9 SDS-PAGE of storage proteins from *M. separata* larvae and pupae of the group treated with celangulin V and the control group

1 3 5 7 9 : 分别为对照组 6 龄第 5 天、第 6 天、末日龄、预蛹及蛹期 The 5th, 6th, last day of 6th instar larva, prepupa and pupa of the control group, respectively ; 2 4 6 8 10 : 分别为处理组 6 龄第 5 天、第 6 天、末日龄、预蛹及蛹期 The 5th, 6th, last day of 6th instar larva, prepupa and pupa of the treatment group, respectively ; M : 分子量标准 Marker.

从图 8 和图 9 可看出,经苦皮藤素 V 亚致死浓度处理 6 龄粘虫第 2 3 4 日龄的血淋巴中储存蛋白的含量明显低于对照组试虫体内储存蛋白的含量;到 5 日龄 6 日龄,末日龄,预蛹及蛹期储存蛋白的含量与对照组试虫体内的含量没有明显差异。这可能是由于试虫较小时,苦皮藤素 V 抑制了储存蛋白

的合成,随着试虫的生长发育,苦皮藤素 V 被体内解毒酶系逐渐代谢,并且随着试虫日龄的增加,试虫本身合成储存蛋白的能力也在增加的结果。

2.4 经苦皮藤素 V LC_{45} 处理粘虫后对成虫产卵量的影响

用苦皮藤素 V LC_{45} 处理粘虫后,对照组成虫平均产卵量为 102 ± 1 (粒/雌),处理组成虫平均产卵量为 103 ± 9 (粒/雌),经过 Mann-Whitney 测验,二者在产卵量上没有显著差异 ($U = 5.000, P = 0.857$)。这可能是由于在粘虫生长发育期间,随着龄期的增加,它体内的药剂逐渐被代谢,从而使它能够恢复正常生长发育。

4 讨论

昆虫储存蛋白是一类特异性血淋巴蛋白,这类蛋白在幼虫或若虫期的脂肪体合成后释放入血淋巴。早先的研究认为,储存蛋白为幼虫特异性蛋白,在全变态幼虫期合成,成虫期则缺少。但 Wyatt (1990)在直翅目东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 中发现有两种储存蛋白,一种在羽化后即告消失,即幼虫储存蛋白,另一种一直延续到成虫期,称持续性储存蛋白。此外,Benes 等(1990)在双翅目果蝇 *Drosophila melanogaster*, Koopmanschap 等(1992)在鞘翅目马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata*, Wheeler 等(2000)在鳞翅目小菜蛾 *Plutella xylostella* 也发现了成虫持续性蛋白。但直至目前,该类蛋白也只是在少数昆虫中报道。本研究发现,粘虫蛹期储存蛋白可同时与 SP-1 和 SP-3 的抗体起交叉反应,由此可见,蛹期有 2 种储存蛋白,即 SP-1 和 SP-3,但 SP-1 于成虫羽化后消失,而 SP-3 在成虫期持续表达,这说明粘虫成虫中存在持续性储存蛋白。这是在鳞翅目中继 Wheeler 首次在小菜蛾成虫体内发现储存蛋白以来的又一发现,因而也为 Wheeler 关于小菜蛾成虫体内含有储存蛋白的观点提供了又一可靠的证据,但对于它的功能及其在鳞翅目乃至整个昆虫纲的存在普遍性尚待进一步研究。

根据研究过的昆虫发现,昆虫储存蛋白(SP)是由 6 个亚基(70~80 kD)组成的六聚体蛋白,分子量约 400~450 kD;储存蛋白亚基分子量一般都在 70 kD 与 85 kD 之间(Telfer and Kunkel, 1991)。本研究发现粘虫体内储存蛋白的亚基分子量在 94 kD 左右,是否由于储存蛋白存在种的特异性而造成的差异,且这种储存蛋白是否也是 6 个亚基组成的六聚

体,尚待进一步研究。

储存蛋白作为蛋白质和氨基酸的储存库,其降解所得的寡肽或游离氨基酸可为以后成虫的发育和生殖所利用,因此苦皮藤素 V 亚致死剂量处理对粘虫的储存蛋白的影响可能会影响昆虫的生殖。本研究发现,苦皮藤素 V 处理粘虫试虫后,对 2~4 日龄的 6 龄幼虫储存蛋白有显著影响,但对 5 日龄以后的 6 龄幼虫、预蛹及蛹储存蛋白的影响逐渐减小,至成虫期处理组与对照组试虫的体重差异甚微,二者产卵量也无显著差异。由此推测,用苦皮藤素 V 亚致死浓度处理粘虫可能类似于用杀螨王的亚致死浓度处理桃叶对山楂叶螨 *Tetranychus viennensis* 雌成螨生殖的影响(徐学农和王刚,1998),当起初用药处理时,试虫个体较小,药物浓度大,药剂抑制试虫体内蛋白质的合成,但随时间推移,药剂被体内解毒酶系代谢,试虫合成储存蛋白的能力恢复,并且 6 龄期合成储存蛋白能力于最强,因而到试虫生长后期,处理组与对照组没有显著差异。但是如果多次用药,以前食药未致死的个体,重新取食,即在 6 龄储存蛋白合成盛期,用苦皮藤素 V 多次亚致死剂量处理,对粘虫生殖的影响还需进一步研究。

参考文献 (References)

- Aosb F, Jinsd RE, Bult R, 1999. Short Protocols in Molecular Biology. Beijing: Science Press. [F. 奥斯伯, R. E. 金斯顿, R. 布伦特, 1999. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社]
- Benes H, Edmondson R, Fink P, Kejzlarova-Lepesant J, Lepesant JA, Miles JP, Spivey DW, 1990. Adult expression of the *Drosophila Lsp-2* gene. *Devel. Biol.*, 142: 138–146.
- Brock H, Roberts D, 1983. An immunological and electrophoretic study of the larval serum proteins of *Drosophila* species. *Insect Biochem.*, 13: 57–63.
- de Kort C, Koopmanschap A, 1987. Isolation and characterization of a larval hemolymph protein in *Locusta migratoria*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 4: 191–203.
- Danty E, Arnold G, Burmester T, Huet JC, Huet D, Pernollet JC, Masson C, 1998. Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28: 387–397.
- Faria FS, Garcia ES, Goldenberg S, 1994. Synthesis of a hemolymph hexamerin by the fat body and testis of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24: 59–67.
- Gonzalez MS, Soulages J, 1991. Changes in the hemolymph lipophorin and very high density lipoprotein levels during the fifth nymphal and adult stages of *Triatoma infestans*. *Insect Biochem.*, 21: 670–687.
- Gu DJ, Waage JK, 1994. Systemic analysis of sublethal effect of insecticide on *Plutella xylostella* and its parasitoid *Diadegma eucrophaga*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 21(3): 265–268. [古德就, Waage JK, 1994.

农药亚致死剂量对小菜蛾及其天敌优姬蜂的影响. 植物保护学报, 21(3): 265–268]

- Koopmanschap B, Lammers H, de Kort S, 1992. Storage proteins are present in the hemolymph from larvae and adults of the Colorado potato beetle. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 20: 119–133.
- Kunkel J, Lawler D, 1974. Larval-specific serum protein in the order Dictyoptera: immunologic characterization in larval *Blatella germanica* and cross-reaction throughout the order. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47B: 697–710.
- Kunkel J, Grossniklaus-Buergin C, Karpells S, 1990. Arylphorin of *Trichoplusia ni*: characterization and parasite-induced precocious increase in titer. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 13: 117–125.
- Levenbook L, 1985. Insect storage proteins. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology. Pergamon Press, Oxford. 10: 307–346.
- Liu HX, Yang CJ, Lian XH, Wu WJ, 2003. Effects of celangulin V on muscle cells of *Mythimna separata*. *Acta Entomologica Sinica*, 46(4): 417–423. [刘惠霞, 杨从军, 廉喜红, 吴文君, 2003. 苦皮藤素 V 对东方粘虫肌细胞的影响. 昆虫学报, 46(4): 417–423]
- Munn E, Price G, Greville G, 1969. The synthesis *in vitro* of the protein calliphorin by fat body from the larva of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. *Journal of Insect Physiol.*, 15: 1 601–1 605.
- Ryan R, Schmidt J, Law J, 1984. Arylphorin from the hemolymph of the larval honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem.*, 14: 515–520.
- Telfer WH, Kunkel JG, 1991. The function and evolution of insect storage hexamers. *Ann. Rev. Ent.*, 36: 205–228.
- Tojo S, Toyoshi Y, 1994. Purification and characterization of three storage proteins in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 24(7): 729–738.
- Tojo S, Betchaku T, Ziccardi V, 1978. Fat body protein granules and storage proteins in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *J. Cell Biol.*, 78: 823–838.
- Wheeler DE, Tuchinskaya II, Buck NA, Tabashnik BE, 2000. Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera). *Journal of Insect Physiology*, 46: 951–958.
- Wu WJ, Li SB, 1994. New sesquiterpenoid Celangulin V: isolation and determination. *Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalis*, 22(4): 116–117. [吴文君, 李绍白, 朱靖博, 刘惠霞, 1994. 新化合物苦皮藤素 V 的分离与结构鉴定简报. 西北农业大学学报, 22(4): 116–117]
- Wyatt G, 1990. Developmental and juvenile hormone control of gene expression in locust fat body. In: Hagedorn HH, Hildebrand J, Kidwell M, Law JH eds. Molecular Insect Science. Plenum Press, New York. 163–172.
- Xu XN, Wang G, Gao SP, 1998. Effects of sublethal concentration of fenpyroximate on reproduction of *Tetranychus viennensis* Zacher. *Journal of Anhui Agricultural University*, 25(4): 352–353. [徐学农, 王刚, 高仕朋, 1998. 杀螨王的亚致死浓度处理桃叶对山楂叶螨雌成螨生殖的影响. 安徽农业大学学报, 25(4): 352–353]